

Versuche über die quantitative Bestimmung
der β -Indolylessigsäure (Heteroauxin)
und ihre Lokalisierung im Gewebe der Pflanze

INAUGURALDISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER
PHILOSOPHISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT BASEL

VON
VICTOR ALEXANDER EBERT
AUS ZÜRICH

1 9 5 5

Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36

Genehmigt
von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren

DR. MAX GEIGER-HUBER
DR. OTTO SCHÜEPP

Basel, den 16. Dezember 1952

Der Dekan: Prof. Dr. W. KUHN



Veröffentlicht in »Phytopathologische Zeitschrift«, Band 24, Heft 2 (1955)

Versuche über die quantitative Bestimmung
der β -Indolylessigsäure (Heteroauxin)
und ihre Lokalisierung im Gewebe der Pflanze

Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel

Leiter: Prof. Dr. M. Geiger-Huber

Versuche über die quantitative Bestimmung der β -Indolylessigsäure (Heteroauxin) und ihre Lokalisierung im Gewebe der Pflanze

Von

VICTOR ALEXANDER EBERT

Mit 20 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — I. Quantitative Bestimmung des Heteroauxins (IES). A. Übersicht über die Methoden zur Bestimmung der IES. B. Die fluorometrische Bestimmung des Heteroauxins. C. Versuche über die IES-Aufnahme durch Hypokotyle von *Cucumis*. — II. Lokalisierung des aufgenommenen Heteroauxins im Gewebe der Pflanze. A. Die verwendeten Reaktionen. Histochemische Nachweisreaktionen für IES. Nachweis anderer Indolkörper. Methodisches zum Nachweis der IES in Gewebeschnitten. Methodisches zum Nachweis der IES in ganzen Pflanzen. B. Ergebnisse der histochemischen Untersuchung. Der Unterschied in der IES-Speicherung zwischen Wurzel und Sproß. Stellen bevorzugter IES-Speicherung in der Wurzel. Beobachtungen über Permeiergeschwindigkeit und Anreicherung der IES in der Wurzel. Die Aufnahme anderer Wuchsstoffe durch die Wurzel. Die IES-Speicherung durch den Sproß. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Diese Arbeit soll mithelfen, in einer wichtigen Frage der Wuchsstoff-Forschung einen Schritt vorwärts zu tun, nämlich in der Frage der Aufnahme von β -Indolylessigsäure (IES) durch die Pflanze.

Dieses Ziel soll auf zwei Wegen erstrebt werden:

1. durch Verbesserung der Methoden zur quantitativen Messung der Aufnahme der IES aus Lösungen,
2. durch Lokalisierung der aufgenommenen IES im pflanzlichen Gewebe.

Daß die Pflanze IES aufnimmt, erscheint gesichert nach den Untersuchungen von THIMANN und BONNER (1932, 1933) über die Aufnahme von IES aus Agar durch die *Avena*-Koleoptile, von SKOOG (1938) über IES-Aufnahme durch die Tomatenwurzel aus wäßriger Lösung und von ALBAUM, KAISER und NESTLER (1937) über IES-Aufnahme durch *Nitella* aus wäßriger Lösung; SUTTER (1944) und HUBER (1951) konnten die Bedingungen der

Aufnahme von IES aus wässriger Lösung durch *Cucumis*-Hypokotyle genau definieren.

Über das Vorhandensein der IES nach der Aufnahme in der Pflanze aber gehen die Meinungen auseinander. DETTWEILER (1942) und v. GUTTENBERG (1949) behaupten, die IES könne in der Pflanze nicht mehr nachgewiesen werden. Ihre Behauptung wurde durch die Arbeiten von SUTTER (1944, S. 232) und HUBER (1951, S. 527) in Frage gestellt. Diese beiden Autoren versuchten, die IES durch Äther-Extraktion aus den behandelten Pflanzen wieder herauszuholen. Sie beobachteten in diesem Extrakt verschiedene Farbreaktionen, die auf das Vorhandensein von IES schließen ließen und die bei nicht behandelten Pflanzen ausblieben. Beide Autoren konnten den Nachweis allerdings nicht quantitativ führen, da die Reaktionen durch Begleitstoffe im Extrakt gestört wurden. Immerhin konnte HUBER feststellen, daß mindestens so viel IES in die Pflanze eingedrungen war, um mit seiner Methode eine Rotfärbung im Extrakt zu ergeben, und daß in unbehandelten Pflanzen weniger IES vorhanden ist, als seine Reaktion nachzuweisen gestattet.

Es darf also behauptet werden: IES wird durch die Pflanze aufgenommen und kann mit ziemlicher Sicherheit aus ihr wieder extrahiert und im Extrakt nachgewiesen werden. Dafür aber, daß die IES in irgendwelchen pflanzlichen Geweben gespeichert wird, ist noch kein histochemischer Beweis vorhanden.

I. Quantitative Bestimmung des Heteroauxins (IES)

A. Übersicht über die Methoden zur Bestimmung der IES

Es existiert eine größere Anzahl Methoden zum Nachweis der IES, von denen die wichtigsten hier folgen. Einige davon sind zur quantitativen Bestimmung ausgearbeitet.

Reaktionen mit oxydationsmittelhaltigen Reagenzien:

- a) Salzsäure und Eisenchlorid. SALKOWSKI (1885), WINKLER und PETERSEN (1935), LEFÈVRE (1938), BERTHELOT, AMOUREUX und DEBERQUE (1939), MITCHELL und BRUNSTETTER (1939), ZYUNKI TANAKA (1940), HAMENCE (1943 II), ALGEUS (1946), WILDMAN und BONNER (1948), BONNER (1950, S. 443), HUBER (1951).

Modifikationen: Zusatz von Trichloressigsäure STOPPANI (1945); statt Salzsäure Schwefelsäure YU WEI TANG und BONNER (1947); statt Salzsäure Essigsäure KELLER (1896), STOLL, HOFMANN und PETRZILKA (1946).

- b) Salpetersäure und Nitrit. SALKOWSKI (1883, 1885), WINKLER und PETERSEN (1935).

Modifikationen: statt Salpetersäure Schwefelsäure MOLISCH (1921, S. 237), LEFÈVRE (1938); statt Salpetersäure Salzsäure WEISS (1947),

LINSER (1952); mit Salzsäure, Nitrit und Harnstoff HOLT und CALLOW (1943).

- c) Andere Oxydantien. Perchlorsäure HAMENCE (1943 II), als Reaktion auf Tryptophan GORDON und MITCHELL (1949), TAUBER (1952); Chlorkalk SALKOWSKI (1885); Selendioxyd MONTIGNIE (1932); verschiedene Oxydationsmittel HOMER (1915, spektroskopische Daten über verschiedene Indolderivate).

Anmerkung: bei HOMER auch Anwendung von Salzsäure allein, s. ARNOLD (1911), ABDERHALDEN (1946, S. 192).

Reaktionen mit Aldehyden:

- a) EHRLICHsche Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure. GLICK (1949, S. 74, Angaben über störende Stoffe), LEFÈVRE (1938).

Modifikationen: statt Salzsäure Schwefelsäure VAN URK (1929); Phosphorsäure HIEKE (1942/43), MORTON (1946, S. 68 und 106); Zusatz von Oxydationsmitteln SALKOWSKI (1919), GARCIA und ROYO (1943), ALGEUS (1946); Anwendung auf Tryptophan SCHMID (1949), SPIES (1950).

- b) Formaldehyd und Schwefelsäure. MASAYAMA und ITAGAKI (1941).

- c) Glyoxylsäure und Schwefelsäure. WINKLER (1934), WINKLER und PETERSEN (1935), SUTTER (1944), MORTON (1946, S. 115 und 118).

Andere Reaktionen:

- a) LEGALSche Reaktion mit Nitroprussidnatrium. SALKOWSKI (1883).

- b) Oxalsäure. GNEZDA (1899).

- c) Vanillin. WEEHUIZEN (1911).

- d) Diazotierung, Indopheninreaktion, Nitrosamino-reaktion. LISON (1936, S. 160 bis 162).

- e) Methylalkohol und Salzsäure. GRISOLIA (1943).

- f) Schwefelsäure (Fluoreszenzreaktion). HAMENCE (1943 I).

B. Die fluorometrische Bestimmung des Heteroauxins

Die Wahl einer Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der IES erfolgte in der Hoffnung, eine chemisch-physikalische Bestimmungsmethode zu finden, die wesentlich empfindlicher ist als die bisher bekannten. Die hohe Empfindlichkeit der Pflanzen auf Auxine macht dies notwendig, denn nur dann wird es möglich, quantitative Untersuchungen über die Aufnahme von Heteroauxin in Konzentrationsbereichen vorzunehmen, die einigermaßen physiologisch sind.

Die Aussicht hierfür schien nicht ungünstig, denn STRUGGER (1949, S. 11) betont die Überlegenheit der Fluoreszenzanalyse über die kolorimetrische und gibt unter anderem folgendes Beispiel an: Während der Farb-

stoff Lichtgrün in Wasser durch seine Eigenfarbe nur bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ erkannt werden kann, ist die grüne Fluoreszenzfarbe von oxy-pyrentrisulfosaurem Natrium noch bei einer Verdünnung von $1:10^8$ zu erkennen. Nach HAITINGER (1937, S. 155) kann die Fluoreszenz von Chinin noch bei einer Verdünnung von $1:10^8$, diejenige von Uranin bei $1:10^{10}$, die von Fluoreszein und von Rhodamin B in Verdünnungen der Größenordnung $1:10^{12}$ erkannt werden.

In ihrer ausführlichen Arbeit über die IES-Bestimmung gelang es SUTTER (1944), im Reihenversuch IES noch in einer Verdünnung von $1:2,5 \cdot 10^5$ kolorimetrisch nachzuweisen. Andererseits gelingt der biologische Nachweis von IES im Avenatest bis zu Verdünnungen $1:2 \cdot 10^8$ (SÖDING 1952, S. 8). Bekanntlich ist aber die Genauigkeit des biologischen Auxintests klein, gelegentlich ist er auch unzuverlässig, so daß diese Methode trotz ihrer hohen Empfindlichkeit für manche Untersuchungen doch nicht geeignet ist. Außerdem läßt sich im Gegensatz zum relativ umständlichen biologischen Test die Fluoreszenzanalyse mit geeigneten Einrichtungen genau, sicher und rasch durchführen.

Die Aufgabe bestand darin, IES, die in den benötigten Verdünnungen selbst nicht fluoresziert, in einen fluoreszierenden Stoff umzuwandeln und dessen Fluoreszenzlicht photoelektrisch zu messen. Die Spezifität der Messung kann dabei durch Verwendung von Filtern, die auf das Fluoreszenzlicht abgestimmt sind, erhöht werden. Die Fluoreszenz wird durch Belichtung mit Ultraviolett (UV) erzeugt.

Der Meßvorgang selbst beruht entweder auf einer Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität durch Vergleich mit Standardflüssigkeiten bekannter Fluoreszenz (K o m p e n s a t i o n s m e t h o d e) oder auf einer Messung der absoluten Fluoreszenzintensität (A b s o l u t m e t h o d e). Bei der Kompensationsmethode werden gewöhnlich als Standardflüssigkeiten leicht herstellbare Lösungen fluoreszierender Stoffe verwendet, z. B. Chininsulfat für blaue und Fluoreszein für grüngelbe Fluoreszenz. In unserem Institut machte man aber immer wieder die Erfahrung, daß die Stabilität dieser Lösungen ungenügend ist. Ich ging deshalb dazu über, beim Messen von Konzentrationsreihen als Standardlösung für die Bezugsfluoreszenz 100 die höchste IES-Konzentration zu verwenden, so daß alle anderen Fluoreszenzintensitäten dann als Verhältniszahlen zu dieser Konzentration erhalten werden. Die so erhaltenen Kurven zeigten recht gute Übereinstimmung. Als sich jedoch gerade diese hohen IES-Konzentrationen als besonders UV-empfindlich erwiesen und deshalb beim mehrmaligen Nachkontrollieren des Bezugswerts ebenfalls nicht genügend Stabilität besaßen, wurde die Kompensationsmethode aufgegeben.

Die A b s o l u t m e t h o d e ist mit dem Nachteil behaftet, daß sich Spannungsschwankungen der Stromquelle für die Lampe auf die Meßwerte auswirken. Um diese Störung zu vermeiden, wurde dem Fluoreszenz-Meßgerät¹⁾ ein speziell angeglichener Spannungsstabilisator, der Schwankungen

¹⁾ Lumetron Colorimeter Modell 402 E der Photovolt Corporation, Madison Avenue 95, New York.

des elektrischen Stadtnetzes ausglich, vorgeschaltet. Berechnungen zeigten denn auch, daß die Streuung der Einzelwerte bei der Absolutmethode geringer war als bei der verwendeten Kompensationsmethode; deshalb wurden die endgültigen Messungen nur noch nach dieser Methode durchgeführt.

Die Werte der Fluoreszenzintensität sind hierbei immer in Skalenteilen (SKT) des Potentiometers angegeben und nicht in Lichtstärken. Die verwendeten Meßkuvetten machten 17 bis 20 cc Meßflüssigkeit notwendig, die sich zusammensetzen aus 10 bis 12 cc IES-haltiger Bestimmungslösung und 7 bis 10 cc Reagenzien. Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf das Volumen der Meßflüssigkeit.

Für die Ausarbeitung der fluorometrischen Methode wurde von der von HAMENCE (1943 I) beschriebenen Reaktion ausgegangen, wonach IES, in Pulverform mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, eine gelbgrüne Fluoreszenz zeigt. Alle anderen auf Fluoreszenz geprüften IES-Reaktionen ergaben negative Resultate.

Die spezielle Aufgabe bestand darin, die Anpassung dieser Reaktion an stark verdünnte Lösungen der IES vorzunehmen, was auch gelang. Wenn man nämlich zu einer wäßrigen IES-Lösung¹⁾ (Konzentrationsbereich 1 bis 15 γ /cc) konzentrierte Schwefelsäure in geeigneter Weise zugibt, gut durchmischt und das Gemisch in einem kochenden Wasserbad rund 15 Minuten erhitzt, so zeigt sich bei Belichtung mit UV eine blaugrüne bis grüngelbe Fluoreszenz, deren Farbe und Intensität von der Konzentration der IES und den Versuchsbedingungen abhängen. Die verwendete reine Schwefelsäure weist selbst nur eine schwache hellblaue Fluoreszenz auf.

Die Fluoreszenz wird durch folgende Faktoren beeinflusst:

Die Schwefelsäuremenge, die zur Erzeugung einer maximalen Fluoreszenzintensität notwendig ist, weist ein Optimum auf, das je nach der Art der verwendeten Säure zwischen 5 und 8 cc liegt (bei einer Versuchs-

Tabelle 1

Änderung der Fluoreszenzintensität durch Zusatz von Metallsalzlösungen

Zu 10 cc IES-Lösung 2 cc Metallsalzlösung zugegeben, dann, wie gewohnt, mit Schwefelsäure versetzt. Änderung der Fluoreszenzintensität angegeben in % der ohne Salzzusatz zustande kommenden Fluoreszenz

m/10	KCr(SO ₄) ₂	— 45 %		m/20	ZnCl ₂	— 50 %
	NiSO ₄	— 20 %			ZnJ ₂	— 100 %
	CoSO ₄	— 20 %			ZnSO ₄	± 0 %
	CoCl ₂	— 30 %			CdSO ₄	± 0 %
	KMnO ₄	— 100 %			MgSO ₄	± 0 %
	CuSO ₄	+ 75 %			MnSO ₄	± 0 %
	Cu-azetat	+ 100 %			Cr ₂ (SO ₄) ₃	— 20 %
m/15	Hg(NO ₃) ₂	— 70 %			CuSO ₄	+ 150 %

lösung von 12 cc). Dieses Optimum ist von der Konzentration der IES im Bereich zwischen 0 und 15 γ /cc weitgehend unabhängig und zudem flach, was

¹⁾ Es wurde für alle Untersuchungen Indolyl-3-essigsäure der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G., Basel, verwendet.

ermöglicht, größere Konzentrationsreihen mit einer Säuremenge zu behandeln; auch beeinflussen Verschiedenheiten der Säuremenge, wie sie durch Temperaturschwankungen während dem Abmessen der Säure bewirkt werden können, die Resultate nur unbedeutend.

Sehr starken Einfluß auf die Fluoreszenz hat die Qualität der verwendeten Schwefelsäure. In geringsten Spuren vorliegende Verunreinigungen unbekannter Natur können die Fluoreszenz vollständig unmöglich machen; dies wurde von GORDON und MITCHELL (1949) bei ihrer Fluoreszenzreaktion auf Tryptophan auch für Perchlorsäure konstatiert (Abb. 1).

Nach DANCKWORTT (1940, S. 85) ist es bekannt, daß Zink-, Cadmium- und Magnesiumsalze in manchen Fällen fluoreszenzsteigernd wirken. In der Hoffnung, durch Metallsalzzusatz eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu erreichen, wurden die Wirkungen der in Tabelle 1 erwähnten Zusätze geprüft, wobei Salze mit Eigenfluoreszenz unberücksichtigt blieben. Die meisten farblosen Salze zeigen keine Beeinflussung der Fluoreszenz; die farbigen, mit Ausnahme der Kupfersalze, bewirken eine Verminderung, die Kupfersalze dagegen eine starke Erhöhung der Fluoreszenz (Abb. 2). Durch Zusatz von Kupfersalzen kann also die untere Grenze der IES-Bestimmung stark heruntergesetzt werden; zusätzlich nimmt aber auch die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Werte zu. Von diesen Tatsachen wurde bei der Ausarbeitung der Arbeitsvorschrift Gebrauch gemacht. Für die Kupfersulfatmenge besteht ein Optimum von 2 cc der m/20-Lösung auf 10 cc IES-Lösung.

Da die hier verwendeten Konzentrationen an Metallsalzen etwa 1000mal größer sind, als sie in Nährlösungen normalerweise vorkommen, wirkt sich deren Metallionengehalt auf die Fluoreszenzintensität nicht aus. Nitrationen hingegen, die nach SUTTER (1944, S. 217) die kolorimetrische Bestimmung mit Glyoxylsäure-Schwefelsäure empfindlich stören, beeinflussen

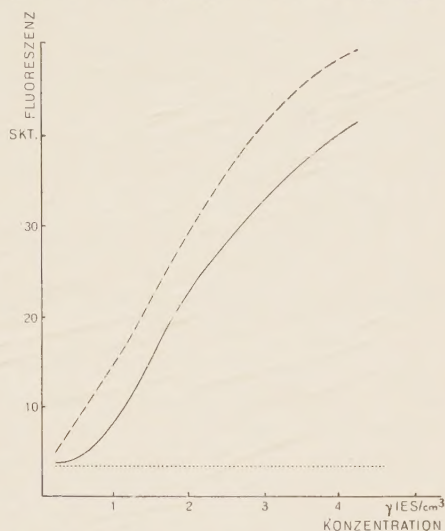


Abb. 1. Einfluß der Säurequalität auf die Intensität der Fluoreszenz
 ----- H_2SO_4 conc. ad analysi $d = 1,84$
 ————— H_2SO_4 conc. chem. rein $d = 1,84$
 H_2SO_4 conc. „chem. rein“ $d = 1,84$ (verunreinigt)

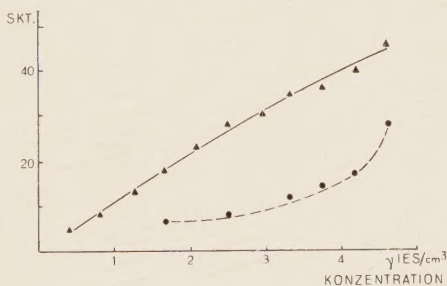


Abb. 2. Einfluß von CuSO_4 auf die Fluoreszenz
 ▲ ————— mit 2 cc m/20 CuSO_4 -Lösung
 · · · · · ohne CuSO_4 -Lösung

auch die fluorometrische Bestimmungsmethode. Diese ist allerdings gegen Nitrationen etwa fünfmal weniger empfindlich als die SUTTERSche Reaktion; Mengen von mehr als 1 mg Calciumnitrat im Bestimmungsgemisch stören die Reaktion aber stark. PFEFFER-ROBBINS-Nährlösung muß demnach etwa auf



Abb. 3. Einfluß des Erwärmens auf die Intensität der Reaktion
 • sofort gekühlt
 ▲ 5 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt
 • 15 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt

Bei der Säurezugabe tritt eine kräftige Erwärmung auf. Da diese nicht immer gleich ist, erscheint es schon zur Konstanthaltung der Versuchsbedingungen angezeigt, das Gemisch so lange zu erwärmen, bis alle Proben die gleiche Temperatur erreicht haben. Es zeigt sich aber auch, daß bei niederen Konzentrationen (unter 2 γ /cc) eine zusätzliche Erwärmung des Versuchsgemisches notwendig ist, damit überhaupt eine Fluoreszenz zustande kommt. Andererseits wird die Fluoreszenz höherer Konzentrationen durch die gleiche Erwärmung beeinträchtigt, denn in diesem Gebiet ist die Fluoreszenz wärmeempfindlich, und bei Kühlung resultieren höhere Werte. Da alle Erscheinungen, die die Erfassung niedrigerer Konzentrationen erleichtern, gemäß unserer Zielsetzung für uns wichtig sind, wird die Reaktion unter fünf Minuten dauerndem Erwärmen im kochenden Wasserbad durchgeführt (Abb. 3).

Die Temperatur übt nicht nur auf das Zustandekommen der Fluoreszenz einen Einfluß aus, sondern auch auf ihre Intensität. Temperaturerhöhung kann allgemein die Fluoreszenz von Lösungen schwächen, verstärken oder unverändert lassen. Eine Steigerung der Fluoreszenz

das Zehnfache verdünnt werden. Dies hindert nicht, IES-Lösungen, in die Pflanzenteile eingelegt werden und deren IES-Gehalt nachher fluorometrisch bestimmt werden soll, mit dieser Nährlösung zuzubereiten. Die Einlegeflüssigkeit muß nämlich, wie später noch gezeigt werden wird, auf jeden Fall zehnmal verdünnt werden, um den zur Messung günstigen IES-Gehalt zu erreichen. Stark zuckerhaltige Nährlösungen hingegen, wie z. B. diejenigen nach BONNER-ADDICOTT, machen die direkte fluorometrische IES-Bestimmung unmöglich, da der Zucker durch die Schwefelsäure verkohlt wird.

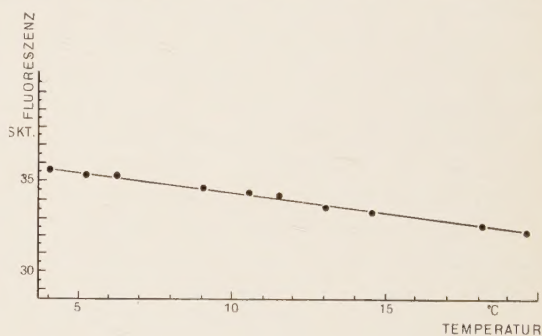


Abb. 4. Einfluß der Meßtemperatur auf die Fluoreszenz
 Konzentration 2,9 γ IES/cc

bei A b k ü h l u n g unter Zimmertemperatur ist die häufigste Erscheinung, und sie ist auch bei der hier besprochenen Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 4). Die Verstärkung der Fluoreszenz beträgt im Konzentrationsgebiet zwischen 0 und 12,5 γ IES/cc etwa 1 % je 1 ° C Abkühlung (bei Temperaturen zwischen + 4 und + 20 ° C). Die Verstärkung ist bei Wiedererwärmung weitgehend reversibel. — Eine praktische Bedeutung hat diese Fluoreszenzverstärkung nicht. Zur Tiefersetzung der Erkennungsgrenze läßt sie sich nicht verwenden, da die Tendenz der abgekühlten Lösung zur Wiedererwärmung auf Zimmertemperatur während des Meßvorgangs nur einen zusätzlichen Unsicherheitsfaktor in die Messung einführt. Es ist aber wichtig, daß alle Proben die gleiche Temperatur aufweisen, wenn sie zur Messung kommen, was erreicht wird, wenn sie vor der Messung einige Zeit im Versuchsraum stehengelassen werden. Die Temperaturschwankungen im Instrument sind im Lauf der Messung unbedeutend, so daß durch sie kein wesentlicher Einfluß auf die Resultate ausgeübt wird.

Längeres K o c h e n des Fluoreszenzgemisches über der offenen Flamme zerstört die Fluoreszenz.

B r u n n e n w a s s e r als Lösungsmittel für die IES kann die Intensität der Fluoreszenz durch Kupfersalz-Ausfällung etwas vermindern, ebenso Z i t r o n e n s ä u r e - P h o s p h o r s ä u r e p u f f e r. In beiden Fällen genügt aber ein leichtes Ansäuern der Kupfersulfatlösung, um die Störung zu vermeiden.

Über den Einfluß von L u f t, L i c h t und U l t r a v i o l e t t ist folgendes zu sagen: Fluoreszierende Versuchslösungen mit einem IES-Gehalt von 2 bis 4 γ /cc, die 24 Stunden offen stehengelassen wurden und dabei etwa 14 Stunden am diffusen Tageslicht standen, erlitten eine Fluoreszenzverminderung von 50 %. Die Fluoreszenz von im Dunkeln aufbewahrten Proben blieb unverändert. Für die kurze Zeit, während der die Proben beim Messen dem Licht ausgesetzt sind, sind keine großen Schädigungen zu erwarten. Es empfiehlt sich, die Proben mit einem schwarzen Tuch zuzudecken und immer darauf zu achten, daß alle Lösungen, die miteinander verglichen werden sollen, gleich lang aufbewahrt werden. U V - L i c h t zerstört bei längerer Einwirkung die Fluoreszenz. Einwirkungszeiten, wie sie bei den einzelnen Messungen vorkommen, üben keinen Einfluß aus. Merkwürdig wird die Schwächung aber bei wiederholten Messungen, z. B. an Standardlösungen. Wie schon erwähnt, ist dies der Grund, warum die Fluoreszenzmessung nach der Kompensationsmethode aufgegeben wurde.

Aus den gewonnenen Ergebnissen geht die folgende A r b e i t s v o r s c h r i f t für die fluorometrische quantitative Bestimmung von IES in wässrigen Lösungen hervor:

Zu 10 cc wässriger IES-Lösung in einer Konzentration von 0,2 bis 12,5 γ IES/cc gibt man 2 cc m/20 Kupfersulfatlösung und läßt dann aus einer Bürette 5 cc konzentrierte Schwefelsäure (ad analysi, $d = 1,83$ bis $1,84$) so einlaufen, daß eine gute Durchmischung stattfindet. Das Gemisch wird während fünf Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt, nachher fünf

Minuten unter laufendem Wasser gekühlt, und dann bis zur Erreichung der Zimmertemperatur im Dunkeln stengelassen. Messung der Intensität der Fluoreszenz, die durch Belichtung mit UV-Licht entsteht, photoelektrisch in einem geeigneten Fluoreszenzometer, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht durch Sekundärfilter filtrierte wird.

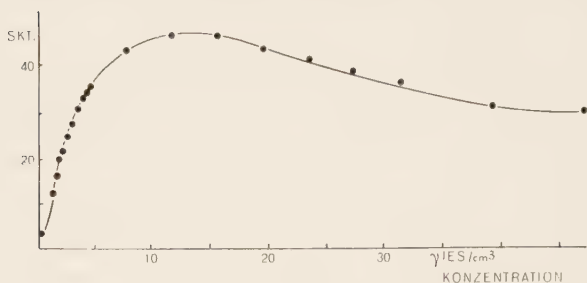


Abb. 5. Konzentrationslöschung der Fluoreszenz

Die Grenzen, innerhalb derer die Reaktion gut durchgeführt werden kann, sind 0,2 γ und 12,5 γ IES/cc. Geringere Konzentrationen als 0,2 γ /cc, d. h. größere Verdünnungen als $1:5 \cdot 10^6$, können nicht erkannt werden, da unterhalb dieser Konzentration die Fluoreszenz in Farbe und Intensität gleich wird wie diejenige der Reagenzien. Oberhalb von 12,5 γ /cc tritt das Phänomen der Konzentrationslöschung (FÖRSTER 1951) auf, das die Messung unmöglich macht (Abb. 5).

Die Messungen erfolgen mit Vorteil im Bereich zwischen 0,8 und 3,8 γ /cc, wo die Streuung am geringsten ist und für den auch eine Eichkurve aufgestellt werden kann (Abb. 6), die aber nur für eine bestimmte Säurequalität gilt.

Die Empfindlichkeit der Methode ist so groß, daß im eben erwähnten Gebiet Konzentrationen, die 0,05 bis 0,1 γ /cc auseinanderliegen, noch unterschieden werden können.

Nach einiger Übung ist die Streuung der Versuchsergebnisse klein. Die mittlere Abweichung σ des Einzelwertes, berechnet nach

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{F}},$$

wobei d = Differenz der Einzelwerte zu ihrem arithmetischen Mittel und F = die Zahl der Freiheitsgrade (d. h. Zahl der Einzelwerte n minus 1) ist, beträgt für die Bestimmungen im Gebiet zwischen 0,8 und 3,8 γ IES/cc 2 bis 3 %. Werden die Messungen an den gleichen Versuchslösungen (IES)

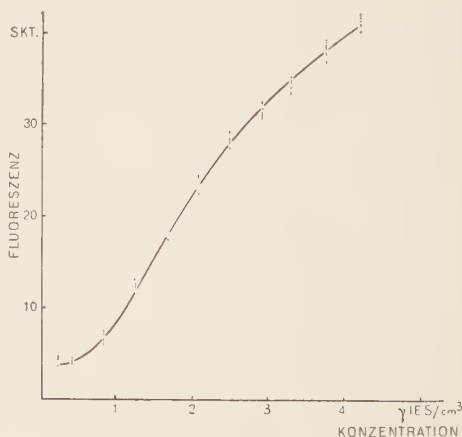


Abb. 6. Eichkurve
(8 aufeinanderfolgende Versuche)

n-mal wiederholt, so ist die mittlere Abweichung m des Mittelwerts nach $m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ meistens unter 1 %.

Beispiel:

Eine IES-Lösung der Konzentration 4,2 γ /cc wurde jeweils elfmal zubereitet, der Reaktion unterworfen und gemessen. Es resultierten folgende Einzelwerte der Fluoreszenz: 41,5 — 43 — 43 — 41,2 — 41,5 — 42 — 42,8 — 43 — 42,2 — 41 — 43,5, der Mittelwert beträgt 42,2, $\sigma = 0,85$ (~ 2 %), $m = 0,28$ ($\sim 0,7$ %).

In der Annahme, daß es sich hier um eine für den Indolkern typische Reaktion handle, wurde auch untersucht, wie weit Tryptophan (β -Indol-alanin) reagiert. Es zeigte sich, daß die Reaktion zur Bestimmung von Tryptophan ungeeignet ist. Allerdings entwickelt sich im UV-Licht eine Fluoreszenz von gleicher Farbe wie bei IES. Sie ist aber so schwach, daß sie für quantitative Bestimmungen nicht in Frage kommt. Statt der bei der IES-Reaktion auftretenden stark roten Eigenfarbe ist bei Tryptophan eine schwache Gelbfärbung zu beobachten.

C. Versuche über die IES-Aufnahme durch Hypokotyle von *Cucumis*

Wenn man die Aufnahme von IES durch Pflanzenteile aus wässriger Lösung bestimmen will, so kann das auf zwei Arten geschehen:

1. Durch Extraktion der aufgenommenen IES aus den Pflanzenteilen und Bestimmung der IES-Menge im Extrakt;
2. durch Feststellung der IES-Abnahme in der Einlegeflüssigkeit, wobei vorausgesetzt wird, daß die hier verschwundene Menge aufgenommen wurde (SUTTER 1944, S. 221).

Die erste Methode hat sich als schwierig erwiesen (SUTTER 1944, S. 232, HUBER 1951, S. 527). Auch bei der zweiten gelang es SUTTER nicht, die Abnahme der IES direkt durch ihre Bestimmung in der Einlegeflüssigkeit nachzuweisen, da von den Pflanzenteilen Stoffe abgeschieden wurden, die die Reaktion störten. Zur Trennung von diesen hat sie mit Äther extrahiert und dann die IES bestimmt.

Ich verwendete die zweite Methode, und zwar sind meine Versuche darauf gerichtet, die Verwendbarkeit der fluorometrischen Methode zur direkten Bestimmung der IES in der Einlegeflüssigkeit unter Vermeidung jeglicher Extraktionsarbeit zu erproben.

Um den Einfluß der Stoffe, die von Pflanzen abgegeben werden, zu bestimmen, wurden IES-Lösungen mit Wasser zubereitet, in das Hypokotyle von *Cucumis* eingelegt worden waren. *Cucumis sativus* wurde als Versuchsobjekt gewählt, um einerseits auf die Erfahrungen von SUTTER (1944) und HUBER (1951) zurückgreifen zu können und um andererseits die Möglichkeit zu haben, die Versuchsergebnisse zu vergleichen¹⁾.

¹⁾ Aufzucht der Gurkenkeimlinge nach HUBER (1951, S. 506); im Dunkeln, bei 20 bis 25 ° C. Verwendete Samen: Landgurken, grüne, lange, verbesserte Schlangen, HABA No. 2078, Ernte 1950, F. Haubensak Söhne A.G., Basel.

Würden von den Hypokotylen fluoreszierende Stoffe abgegeben, wie dies METZNER (1930) bei den meisten keimenden Samen konstatiert, so wären die Versuchsergebnisse von vornherein gefährdet. Meine Versuche zeigten, daß

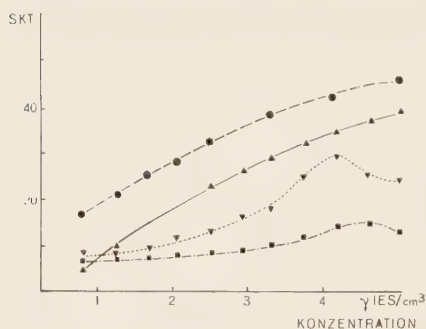


Abb. 7. Veränderung der Fluoreszenz durch „Versuchslösung“. IES zubereitet mit Wasser, in dem Hypokotyle von *Cucumis* verschieden lang eingelegt waren (= „Versuchslösung“)

- — • ohne Versuchslösung
- · · · · Einlegezeit 7 Stunden
- ▼ · · · · ▼ Einlegezeit 14 Stunden
- · · · · Einlegezeit 17 Stunden

acht Stunden eingelegt und die Vergleichslösungen geeignet, d. h. mit Wasser, in das die gleiche Anzahl Hypokotyle eingelegt war, zubereitet werden.

Zur Messung der IES-Aufnahme werden die Pflanzenteile in eine IES-Lösung von bekanntem Gehalt eingelegt und nach Ablauf der Einlegezeit wird der Gehalt dieser „Versuchslösung“ fluorimetrisch bestimmt. Ist IES durch die Pflanze aufgenommen worden, so wird eine Verkleinerung der IES-Konzentration der Lösung festzustellen sein. Eine enzymatische Zerstörung der IES, die die Resultate verfälschen könnte, tritt, wie SUTTER (1944, S. 221) und HUBER (1951, S. 530) feststellten, bei entsprechender Versuchsanstellung nicht auf. Über den oxydativen Zerfall der IES, wie ihn ALGEUS (1946) bespricht, ergaben eigene Versuche folgendes: IES-Lösungen der Konzentration 50 γ/cc, die zwölf Stunden offen stehen gelassen wurden, zeigten keine Abnahme ihres IES-Gehalts; nach vier Monaten war dann eine Abnahme von 50 % festzustellen. Bei Einlegeversuchen, die mit gepufferten IES-Lösungen niederer Konzentration im Dunkeln und kurzfristig durchgeführt werden, ist auch bei Versuchstemperaturen von 25 °C keine Abnahme des IES-Gehalts durch Zerfall anzunehmen.

Zur Bestimmung der IES-Abnahme wird jeweils von jeder Probe der Versuchslösung eine Konzentrationsreihe angefertigt und diese mit dem Gehalt von in gleicher Weise zubereiteten Vergleichslösungen verglichen. Die Abnahme wird in Prozent des Gehalts der Vergleichslösung ausgedrückt und von diesen prozentualen Abnahmen der Mittelwert bestimmt.

dies in den ersten acht Stunden Einlegezeit nicht vorkommt. Erst bei längerem Einlegen treten blau fluoreszierende Stoffe auf. Möglicherweise handelt es sich dabei um die „uncharakteristische Blafluoreszenz“ KOSCHARAS (1936), die von nicht näher bestimmten Naturstoffen hervorgerufen wird. Es sei hier auch auf KISSER (1950) hingewiesen.

Bei kurzen Einlegezeiten werden die Kurven allerdings in bezug auf die mit den reinen IES-Lösungen erhaltenen etwas verschoben, können aber gut ausgewertet werden (Abb. 7), wenn entsprechende Eichkurven aufgestellt sind.

Die fluorometrische Bestimmungsmethode kann also angewendet werden, wenn Einlegezeiten von weniger als

acht Stunden eingelegt und die Vergleichslösungen geeignet, d. h. mit Wasser, in das die gleiche Anzahl Hypokotyle eingelegt war, zubereitet werden.

Für die Einlegeversuche werden Hypokotyle von *Cucumis* verwendet, bei denen die Kotyledonen so entfernt sind, daß die anschließende Wachstumszone am Hypokotyl bleibt und die Wurzeln kurz oberhalb des Wurzelhalses abgeschnitten wurden. Diese geraden Stücke werden in die Lösung eingelegt.

80 Hypokotyle von 4 cm Länge (Alter fünf Tage) werden drei Stunden bei 24 ° C im Dunkeln in 50 cc gepufferte IES-Lösung (Konzentration 50 γ IES/cc = $2,86 \cdot 10^{-4}$ mol, 20 % Zitronensäure-Phosphorsäure-Puffer pH 5) eingelegt. Dann wird die Versuchslösung geeignet verdünnt und ihr IES-Gehalt fluorometrisch bestimmt. Zur Zubereitung der Vergleichslösung dient eine Pufferlösung (destilliertes Wasser + 20 % Puffer pH 5), in die 80 Hypokotyle unter gleichen Bedingungen eingelegt waren.

Ergebnisse:

In neun derart angestellten Versuchsreihen zu je fünf Doppelmessungen zeigte sich eine Abnahme des IES-Gehalts der Versuchslösung von 9,05 bis 10,9 %; die durchschnittliche Abnahme beträgt $9,9 \pm 0,7$ %. In γ IES ausgedrückt: Die 80 Hypokotyle nahmen in drei Stunden $247,5 \pm 15 \gamma$ IES auf.

Das Volumen von 80 Hypokotylen beträgt etwa 7,30 cc (SUTTER 1944, S. 227). Wenn, wie SUTTER (S. 224) feststellt, die Hypokotyle so viel IES aufnehmen, daß die IES-Konzentration in dem in ihnen enthaltenen Wasser ($97,5 \% = 7,10$ cc) gleich groß wird wie diejenige der Lösung, in die sie eingelegt sind (Gleichgewichtskonzentration), so müßten 355 γ IES aufgenommen werden. Die in drei Stunden aufgenommenen $247,5 \pm 15 \gamma$ stellen ~ 70 % der Gleichgewichtskonzentration dar. (SUTTER gibt bei der gleichen Temperatur für drei Stunden eine Erreichung von 75 % der Gleichgewichtskonzentration an.)

II. Lokalisierung des aufgenommenen Heteroauxins im Gewebe der Pflanze

A. Die verwendeten Reaktionen

Für die Wuchsstoff-Forschung ergibt sich nicht nur die Notwendigkeit der quantitativen Bestimmung der aufgenommenen Wuchsstoffe, sondern ebenso wertvoll wäre ihre Lokalisierung im pflanzlichen Gewebe. Deswegen wurden Untersuchungen nach dieser Richtung unternommen.

Beim histochemischen Nachweis von Substanzen handelt es sich meistens um eine selektive Anfärbbarkeit von Gewebeteilen oder Zellbestandteilen mit Farbstoffen oder um die Bildung von farbigen Produkten bei der Einwirkung von Reagenzien. Dabei können auch fluoreszierende Stoffe spezifisch adsorbiert werden oder Fluoreszenzfarben unter dem Einfluß von Reagenzien entstehen.

Wie ich auf S. 217 bemerkte, existiert eine ganze Anzahl Farbreaktionen auf IES, man vermißt aber eine s p e z i f i s c h e Reaktion. Besonders wichtig wäre die Unterscheidbarkeit von IES und Tryptophan, da dieses in der

Pflanze häufig vorkommen dürfte. Die größte Spezifität für IES wird der SALKOWSKI - Reaktion zugeschrieben (Nachweis mit eisenchloridhaltiger Salzsäure) (BONNER 1950, S. 443, WINKLER und PETERSEN 1935). Meine Versuche zeigen, daß die Unterscheidbarkeit von Tryptophan im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,2 bis 500 γ /cc gesichert ist, da das Reagens mit Tryptophan keine Reaktion zeigt. Auch die Kupfersulfat-Schwefelsäure-Reaktion (S. 223) erlaubt die Unterscheidung durch die Eigenfarbe (nicht aber durch die Fluoreszenzfarbe).

Da aber jedes Ergebnis durch parallel geführte IES-freie Kontrollversuche überprüft werden kann, genügen meistens alle Indolreaktionen, auch wenn sie nicht unbedingt spezifisch sind.

Histochemische Nachweisreaktionen für IES

Als erstes wurde die Kupfersulfat-Schwefelsäure-Reaktion auf ihre histochemische Verwendbarkeit untersucht, denn auch hier hätte ich eine Fluoreszenzreaktion vorgezogen. Es zeigte sich aber, daß die Schwefelsäure durch Verkohlungen jede Struktur zerstört und die auftretende Fluoreszenz überdeckt. Diese Methode scheidet demnach aus.

Als nächstes wurde versucht, diese Verkohlungswirkung zu vermeiden, indem die Schwefelsäure durch eine andere Säure ersetzt wurde. Ein Erfolg trat sofort mit Salzsäure ein. Diese Säure hat den großen Vorteil, als Dampf angewendet werden zu können. Werden Schnitte von Maiskörnern in IES-Lösung eingelegt, dann mit Kupfersulfatlösung getränkt und Salzsäuredämpfen ausgesetzt, so tritt an den Stellen, wo offenbar IES gespeichert wurde, eine intensive Rotfärbung auf. Die Farbe ist streng auf die entsprechenden Gewebe beschränkt. Eine Fluoreszenz bei UV-Belichtung ist nicht zu beobachten.

Auftropfen von SALKOWSKIS Reagens¹⁾ auf solche Schnitte bewirkt ebenfalls eine Rotfärbung der gleichen Gewebe.

Die gleiche Rotfärbung tritt auch bei der alleinigen Anwendung von konzentrierter Salzsäure auf und ist wohl auf ihren Gehalt an Spuren von Eisen oder auf den Eisengehalt der pflanzlichen Gewebe zurückzuführen.

Auch EHRLICH'S Reagens²⁾ eignet sich zum Nachweis von IES in pflanzlichen Geweben. Die Spezifität ist hier aber geringer (GLICK 1949, S. 74). Eigene Beobachtungen zeigten z. B. an Rhizomen von *Convallaria majalis*, die nicht in IES-Lösung eingelegt waren, eine sehr intensive Rotfärbung mit diesem Reagens. Wenn aber Kontrollen das Ausbleiben von solchen Nebenreaktionen sichern, eignet sich das Reagens gut.

Die hauptsächlichsten Störungen der genannten Reaktionen erfolgen durch jene Stoffe, die als Lignin eine positive Phloroglucin- und Anilinsulfatprobe ergeben. Indolkörper sind nämlich in Verbindung mit Säure ebenfalls ein Reagens auf Lignin. Da alle obenerwähnten IES-Reagenzien Säure

¹⁾ 100 cc HCl conc. d = 1,19 + 0,5 cc gesättigte FeCl₃-Lösung + 50 cc Wasser.

²⁾ 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 cc HCl 20 %.

enthalten, kann eine durch sie bewirkte Rotfärbung auch eine Reaktion von IES auf Lignin anzeigen. Die rote Farbe beweist allerdings auch dann die Anwesenheit von IES, eine scheinbare Bevorzugung eines Gewebes kann aber durch die Anwesenheit von Lignin in diesem Gewebe vorgetäuscht werden. Bei allen Versuchen muß zur Vermeidung von Irrtümern immer die Abwesenheit von Lignin an den Stellen mit positiver IES-Reaktion konstatiert werden. Am unangenehmsten wirkt sich diese Störung in den Gefäßen aus. Bei einiger Übung lernt man übrigens, die IES/Reagens-Reaktion von der IES/Lignin-Reaktion an ihrer Farbe und ihrem Aussehen zu unterscheiden.

Die IES-Reaktion kann ferner durch das natürliche Vorkommen von roten Farbstoffen wie Anthocyan vorgetäuscht oder verdeckt werden.

Nachweis anderer Indolkörper

Tryptophan kann wie IES mit EHRLICHs Reagens nachgewiesen werden. SALKOWSKI-Reagens reagiert mit Tryptophan nicht und ermöglicht die Unterscheidung.

β -Indolyl-propionsäure gibt mit SALKOWSKI-Reagens eine rote Farbe, mit EHRLICHs Reagens eine violettrote, die rasch in eine intensiv blaue übergeht.

Methodisches zum Nachweis der IES in Gewebeschnitten

a) Kupfersulfat-Salzsäure-Methode. Die leicht abgetrockneten Schnitte werden auf dem Objektträger mit etwas m/20 Kupfersulfatlösung betropft. Man läßt diese zehn Minuten einwirken und setzt dann, am besten unter einer Glasglocke, das Präparat einige Minuten den Dämpfen von konzentrierter Salzsäure aus. Beim Auftreten einer Rotfärbung bewegt man den Objektträger kurz über einer kleinen Flamme, um die Färbung zu verstärken, und spült dann den Säureüberschuß mit Brunnenwasser ab. Die Rotfärbung des Gewebes ist nicht sehr stabil und bleicht beim Stehen an der Luft aus oder geht in Blau über. IES-freie Gewebe bleiben ungefärbt oder färben sich unter dem Einfluß der Salzsäure auf das Kupfersalz gelblich.

b) SALKOWSKI- und EHRLICH-Methode. Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit dem Reagens betropft. Wenn eine Reaktion nicht zustande kommt, überzeugt leichtes Erwärmen davon, ob sie negativ ist oder nur langsam verläuft. Wenn die Reagenzien mit etwas Glycerin vermischt sind, ergibt leichtes Kochen eine deutlichere Reaktion. Der entstehende rote Farbstoff ist bei der SALKOWSKI-Reaktion von größerer Intensität und haltbarer als derjenige der EHRLICH-Reaktion, der beim Trocknen leicht in Blau übergeht, wobei dann die Gewebespezifität Schaden nehmen kann. In verholzten Teilen geht das SALKOWSKI-Rot oft in ein typisches Olivgrün über.

Methodisches zum Nachweis der IES in ganzen Pflanzen

Wenn ganze Pflanzen nach dem Einlegen in IES-Lösungen auf die Speicherung von IES untersucht werden sollen, so werden sie entweder mit

SALKOWSKI- oder EHRLICH-Reagens betropft oder besser einige Sekunden in das Reagens eingelegt. Der Säuregehalt der Reagenzien ist nicht derartig groß, daß die Gewebe dadurch sofort zerstört würden. Behandlung mit konzentrierter Salzsäure erzeugt ebenfalls eine intensivere Farbreaktion mit IES, ist aber wegen der zerstörenden Wirkung auf die Gewebe der Pflanze nicht zu empfehlen. Bei genügend langen Einlegezeiten und hohen IES-Konzentrationen (vier Stunden und länger, 250 bis 500 γ IES/cc) erhält man so sehr überzeugende Resultate. Niedere, physiologisch günstigere Konzentrationen wie 50 γ /cc ergeben immer die gleichen Lokalisierungen, aber entsprechend schwächere Reaktionen.

B. Ergebnisse der histochemischen Untersuchung

Einleitend muß definiert werden, was in der Folge als positiver Nachweis aufgenommenener IES in der Pflanze betrachtet wird:

Wenn an Pflanzenteilen, bei denen die Abwesenheit von Lignin und von Farbstoffen, wie Anthocyan, konstatiert wurde und die der Einwirkung von IES unterworfen wurden, mit den auf Seite 228 ff. erwähnten Reagenzien eine Rotfärbung auftritt, so wird diese Reaktion als positiver Beweis für die Aufnahme der IES und ihre Speicherung an der betreffenden Stelle gewertet.

Wenn an der betreffenden Stelle das Vorhandensein von Stoffen, die eine positive Ligninreaktion ergeben, konstatiert wurde, so kann aus einer dort stattfindenden Rotfärbung wohl auf das Vorhandensein von IES geschlossen werden, nicht aber auf eine besondere Affinität jener Stelle zur IES.

Ein in diesem Sinne erfolgreicher Nachweis der IES wird immer als „positive IES-Reaktion“ bezeichnet. Unter „negativer Reaktion“ verstehe ich das vollständige Ausbleiben des genannten Phänomens.

Es wird ferner nie besonders vermerkt, daß alle Ergebnisse stets durch Vergleich mit den entsprechenden IES-freien Kontrollen gesichert sind.

Der Unterschied in der IES-Speicherung zwischen Wurzel und Sproß

An verschiedenen Pflanzen wurde eine Erscheinung entdeckt, die hier vorerst am Maiskeimling demonstriert werden soll: die viel intensivere Aufnahme und Speicherung der IES durch die Wurzel im Vergleich zum Sproß.

Wenn Schnitte von gequollenen Maiskörnern, die längs durch den Embryo gehen, in IES-Lösung eingelegt und diese Schnitte nachher einer IES-Reaktion unterworfen werden, so zeigt sich eine positive Reaktion zuerst und am stärksten in der Radicula, später und wesentlich schwächer in der Koleoptile. Alle anderen Teile des Maiskorns (Scutellum, Endosperm und Fruchtschale) geben eine negative IES-Reaktion. Es zeigt sich also eine wesentliche Bevorzugung der Wurzel vor dem Sproß (Abb. 8).

Legt man ganze Maiskörner verschiedener Keimungsstadien in IES-Lösung ein, so kann man eine positive IES-Reaktion der Koleorhiza erkennen, sobald diese die Fruchtschale durchstoßen hat. Wenn der Sproßteil

ebenfalls aus dem Korn herausgetreten ist, zeigt er hingegen eine negative IES-Reaktion (etwa am fünften Tage nach Beginn des Quellens in laufendem Brunnenwasser, s. Abb. 9). In den folgenden Tagen und Keimungsstadien bleiben diese Erscheinungen unverändert, bis die Wurzel die Wurzelscheide durchstößt (sechster/siebenter Tag). Die Reaktion des Sprosses bleibt negativ, die der Wurzelscheide positiv, die austretende Wurzelspitze aber reagiert noch stärker positiv als die Koleorhiza.

Längsschnitte durch diese jungen Keimlinge zeigen ein entsprechendes Bild. Solange die Wurzel von der Wurzelscheide umschlossen ist, zeigt hauptsächlich die letzte eine positive Reaktion. Ebenfalls positiv, aber vorläufig noch schwach, reagiert die Wurzel selbst. Der Sproß hingegen zeigt negative Reaktion, mit Ausnahme des Vegetationspunktes, der deutlich positiv reagiert. — Wenn die Wurzel die Koleorhiza durchstoßen hat, zeigt ihre Spitze eine wesentlich verstärkte Reaktion, und die ganze Epidermis reagiert stärker als die Koleorhiza.

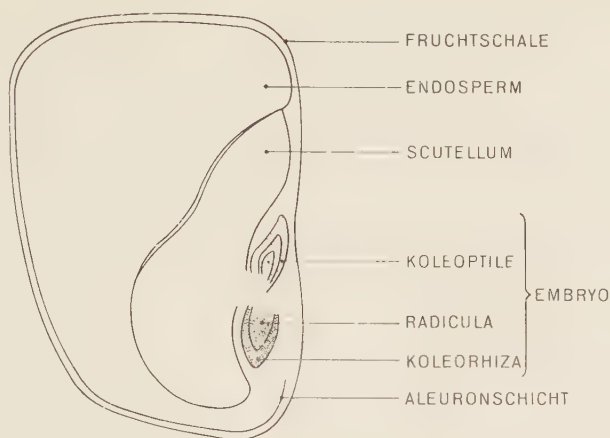


Abb. 8. Anreicherung von IES im Schnitt eines Maiskorns. Schnittstärke etwa $100\ \mu$, Schnitte 4 Stunden im Dunkeln in IES $500\ \gamma/\text{cc}$ eingelegt.

Nachweis: CuSO_4/HCl . Punktiert: positive Reaktion

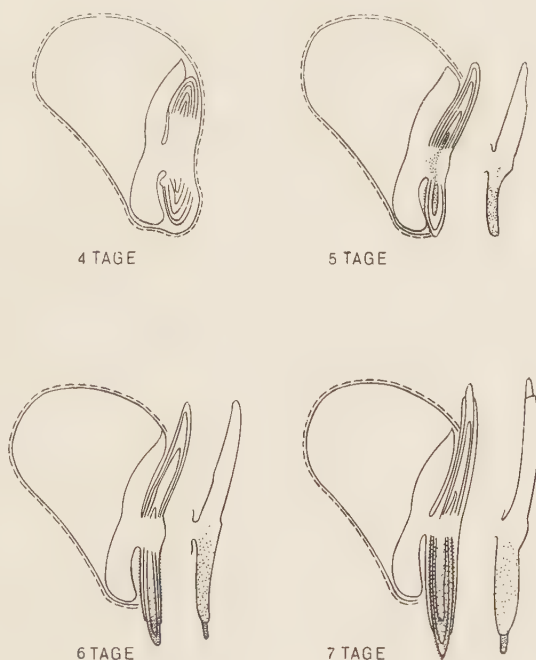
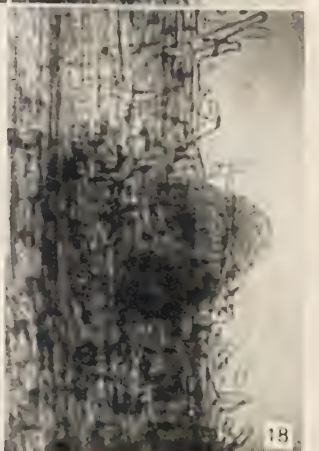
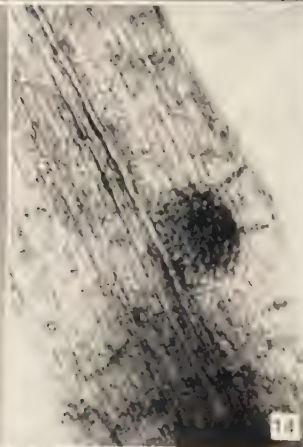
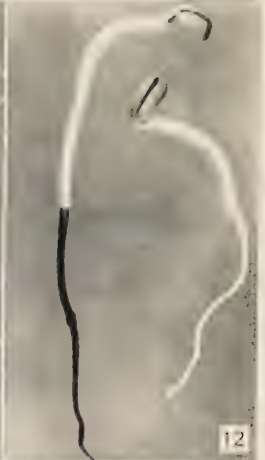


Abb. 9. IES-Aufnahme durch *Zea Mays*. Körner verschiedenen Alters je 40 Stunden in IES $500\ \gamma/\text{cc}$ eingelegt. Punktiert: SALKOWSKI-Reaktion positiv

Schnitte durch Maiskörner in einem jüngeren Stadium, wo die Fruchtschale noch intakt ist, lassen deutlich erkennen, dass diese Schale von der IES



nicht oder doch nicht in einem durch meine Methoden erkennbaren Maß durchdrungen wird: es ist keine positive IES-Reaktion am Embryo festzustellen¹⁾. Im gleichen Stadium zeigen Schnitte, wie oben festgestellt, eine große Affinität des Embryos für IES.

Solange man auch die Entwicklung der Keimlinge weiter verfolgt, immer ist die kräftige positive IES-Reaktion der Wurzel und die negative des Sprosses erkennbar.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden: Bei Betrachtung der Keimpflanze kann eine auffallend starke IES-Reaktion der Wurzel im Unterschied zu derjenigen des Sprosses beobachtet werden. Ich interpretiere dies im Sinne einer größeren *Aufnahmeintensität* der Wurzel, was eine Erklärung liefern würde für den von GEIGER-HUBER und BURLE¹ (1936) konstatierten geringeren IES-Bedarf der Wurzel zur Erreichung des gleichen Wachstumseffekts wie beim Sproß. Wenn die Intensität der Wachstoffsaufnahme der Wurzel größer ist als die des Sprosses, so kann die Wurzel eine ihr zur Verfügung stehende IES-Lösung besser ausnützen als der Sproß; es genügt also schon eine kleinere IES-Menge zur Erreichung des gleichen Effekts. Wenn die genannten Autoren eine maximale Förderung des Wachstums von Maiswurzeln durch eine IES-Konzentration von $3 \cdot 10^{-11}$ mol und des Sprosses von 10^{-5} mol finden, so könnte dies von einer 10^6 mal größeren Aufnahmeintensität der Wurzel herrühren.

Die erhöhte Aufnahme- und Speicherungsintensität der Wurzel für IES gegenüber dem Sproß ist bei allen untersuchten Pflanzen festzustellen. Immer liegt die Grenze zwischen den zwei Farbzonen am Wurzelhals, unbeeinflusst z. B. durch die Tatsache, ob es sich um Pflanzen mit hypogäischer oder epigäischer Keimung handelt.

¹⁾ Dieser Befund dürfte im Hinblick auf die IES-Behandlung von Saatgut interessant sein. Nach SÖDING (1952, S. 289) „scheinen Untersuchungen über die Art und das Ausmaß des Eindringens der Wirkstoffe in den Samen vollständig zu fehlen“.

Abb. 10. *Cucumis sativus* (Alter 7 Tage). Pflanze links 10 Std. in IES 500 γ /cc eingelegt (18°C , dunkel). Sproß zeigt negative, Wurzel positive SALKOWSKI-Reaktion; Grenze = Wurzelhals. Pflanze rechts in Wasser eingelegte Kontrolle. Sproß und Wurzel zeigen keine SALKOWSKI-Reaktion

Abb. 11. *Phaseolus vulgaris* (Alter 5 Tage). Pflanze links 10 Std. in IES eingelegt (wie oben). Pflanze rechts in Wasser eingelegte Kontrolle. SALKOWSKI-Reaktion wie oben

Abb. 12. *Lupinus albus* (Alter 5 Tage). Pflanze links 10 Std. in IES eingelegt (wie oben). Pflanze rechts in Wasser eingelegte Kontrolle. SALKOWSKI-Reaktion wie oben. (Wurzelhals bei beiden Pflanzen in der gleichen Höhe)

Abb. 13. *Pisum sativum* (Alter 5 Tage). Versuchsbedingungen wie oben. Die Primordien der Seitenwurzeln und ihre heraustretenden Spitzen heben sich durch ihre stark positive SALKOWSKI-Reaktion deutlich von der übrigen Wurzel ab

Abb. 14 bis 18. *Cucumis sativus* (Alter 7 Tage). Versuchsbedingungen wie oben. Seitenwurzel-Primordien in verschiedenen Entwicklungsstufen: positive SALKOWSKI-Reaktion (in der Photographie deutlich dunkler). In den Wurzelhaaren und in den übrigen Geweben Reaktion negativ

Untersucht wurden die folgenden Pflanzen: *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Vicia faba*, *Arachis hypogaea*, *Zea Mays*¹⁾ (Abb. 10 bis 13).

Stellen bevorzugter IES-Speicherung in der Wurzel

Die Erscheinungen an der Wurzel sollen im Detail hier am ein bis sieben Tage alten *Cucumis*-Keimling besprochen werden.

Die IES-behandelte Wurzel reagiert auf IES-Reagenzien nicht nur als Ganzes stärker als der Sproß, sondern es lassen sich deutlich besonders intensiv reagierende Stellen an den Wurzelspitzen unterscheiden.

Bei mikroskopischer Betrachtung kann an Haupt- und Seitenwurzeln folgendes festgestellt werden:

Die Wurzelhaube zeigt negative Reaktion; sie ist in allen Fällen IES-frei.

Die positive Reaktion beginnt mit den Initialzellen, erstreckt sich über die ganze Zone des embryonalen Wachstums mit ihren kubischen kleinen Zellen (Meristem) und über die Streckungszone mit den langen Zellen. In dieser Zone konzentriert sich die positive Reaktion bald immer mehr auf das Zentrum der Wurzel und läuft dann zusammen in dem Zentralzylinder gegen die hier beginnenden Gefäße. Hier ist die Wurzelrinde also frei von so nachweisbarem IES. Die Zone positiver IES-Reaktion ist bei *Cucumis* nur einige Millimeter lang, bei *Pisum* und *Phaseolus* ist sie etwas länger. Im weiteren Verlauf der Wurzel wird die kräftigste Reaktion im Zentralzylinder angetroffen. Die Lokalisierung ist hier wegen des Ligningehalts der Gefäße schwierig. Ein Vergleich zwischen einer IES-freien Wurzel, die mit Phloroglucin auf Lignin geprüft wird, und einer IES-behandelten Wurzel zeigt aber, daß auch das die Gefäße umgebende ligninfreie Parenchym eine positive IES-Reaktion aufweist.

Die Wurzelrinde bleibt durch die ganze Wurzel IES-arm. Immerhin enthält sie, wie schon gesagt, mehr IES als der Sproß. In keiner der untersuchten IES-behandelten Pflanzen konnte ich IES in den Wurzelhaaren nachweisen (Abb. 15).

Interessant ist das Verhalten der entstehenden Seitenwurzeln. Sobald im Perizykel die Primordien gebildet sind, findet man in ihnen eine positive IES-Reaktion, die ebenso kräftig ist wie die der Haupt- und Seitenwurzeln. Sie heben sich dadurch vom umgebenden Wurzelgewebe deutlich ab und fallen schon bei Betrachtung mit bloßem Auge stark auf (Abb. 13). Die positive Reaktion ist eindeutig und scharf auf das Gewebe des Primordiums beschränkt (Abb. 14 bis 18). Wenn die Seitenwurzeln die Epidermis der Wurzel durchstoßen, ist dies besonders deutlich sichtbar. Wenn sie eine Länge von ein bis zwei Millimetern erreicht haben, erscheinen sie noch diffus mit IES erfüllt. Später zeigen sie genau das gleiche Zonenbild

¹⁾ Aufzucht der Keimpflanzen: *Cucumis sativus* nach HUBER (1951, S. 506). *Zea Mays* nach SEILER (1951, S. 624), in der gleichen Weise *Pisum sat.*, *Lupinus albus*, *Phaseolus vulg.* — *Vicia faba* und *Arachis hypogaea* in Torf-Sand. Alle dunkel, 20 bis 25°C.

wie die Hauptwurzel. Seitenwurzeln zweiter Ordnung zeigen ein analoges Verhalten.

Bei *Phaseolus*, wo Querschnitte durch die Wurzel besser untersucht werden können, zeigt sich die positive IES-Reaktion im Perizykel, in den Gefäßen (Xylem) und im Phloëm. Der Befund in den Gefäßen ist aber wegen ihres Ligningehaltes mit Vorbehalt zu interpretieren.

Die erwähnte Bevorzugung der wachsenden Zonen ist bei allen untersuchten Pflanzen anzutreffen: *Avena sativa*, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Vicia faba*, *Arachis hypogaea*, *Zea Mays*. Besonders interessant ist die Wachstumszone an Luftwurzeln von *Vanilla planifolia*, die in ihrer ganzen Länge von 5 bis 7 cm eine positive IES-Reaktion zeigt.

Beobachtungen über Permeiargeschwindigkeit und Anreicherung in der Wurzel

Am Mais-Embryo und an den Wurzeln der verschiedensten Pflanzen kann konstatiert werden, daß die aufgenommene IES durch Wässern nicht mehr entfernt werden kann. Tagelanges Wässern in fließendem Wasser verändert den IES-Gehalt an den Speicherungsstellen nicht so, daß die Intensität der IES-Reaktion merklich abnimmt.

Für diese Haftkraft der IES im Gewebe muß sicher ihre große Adsorptionsintensität, wie sie von SUTTER (1944) gegenüber Kohle und von LINSE (1951) gegenüber Aluminiumoxyd festgestellt wurde, und daneben ihr ausgesprochen lipophiler Charakter verantwortlich gemacht werden (GEIGER-HUBER und SUTTER, 1943).

Wie LEPESCHKIN (1938, S. 151) zusammenfassend sagt, hat das Protoplasma die Fähigkeit, „lipidlösliche Stoffe zu lösen, anzuhäufen und durch sich leicht hindurchzulassen“, was „durch die Anwesenheit von Lipoiden in seiner Intermizellarphase erklärt werden“ kann. Es ist nicht notwendig, hier näher auf die Theorien über das Permeieren von Stoffen einzugehen. Die meisten bringen den Permeiervorgang organischer Stoffe u. a. mit dem Lipidgehalt des Plasmas in Zusammenhang. In einem einfachen Modellversuch läßt sich die große Lipophilie der IES folgendermaßen zeigen: ein Filtrierpapier, das durch Eintauchen in heißes Lanolin fettgetränkt ist, und ein unbehandeltes Filtrierpapier werden gleich lang in IES-Lösung eingelegt. Abgetrocknet zeigen beide eine etwa gleich starke IES-Reaktion mit SAL-KOWSKI-Reagens. Nach kurzem Wässern ist das unbehandelte Filtrierpapier aber schon wieder annähernd IES-frei, das fettbehandelte zeigt hingegen noch nach langem Wässern die gleich intensive IES-Reaktion.

Ebenfalls durch den lipophilen Charakter ist das rasche Eindringen der IES in das Gewebe bedingt. Schon nach fünf Minuten zeigen feine *Avena*-Seitenwurzeln, die in IES 500 γ /cc eingelegt sind, positive IES-Reaktion. Dabei ist noch zu bedenken, daß für das Zustandekommen einer positiven Reaktion ziemlich hohe IES-Konzentrationen im Gewebe nötig sind. Durch Adsorptionskraft und lipophilen Charakter ist wohl auch die Erscheinung der Anreicherung im wachsenden Gewebe zu erklären. Die Wachstums-

zonen zeigen durchgehend eine derart intensive Färbung, wie sie mit einem Tropfen der gleichen IES-Konzentration nie zustande kommt. Es wird also in den wachsenden Geweben die IES in ihrer Konzentration erhöht und angehäuft. Dieser Befund, der auch an der Wachstumszone des *Cucumis*-Hypokotyls gemacht wurde, stellt die Meinung SUTTERS (1944, S. 227) in Frage, wonach wachsende und nicht wachsende Teile gleich viel IES aufnehmen.

Es sollte ferner festgestellt werden, ob die von ALGEUS (1946) konstatierte Unwirksamkeit der IES in neutraler Lösung darauf zurückzuführen

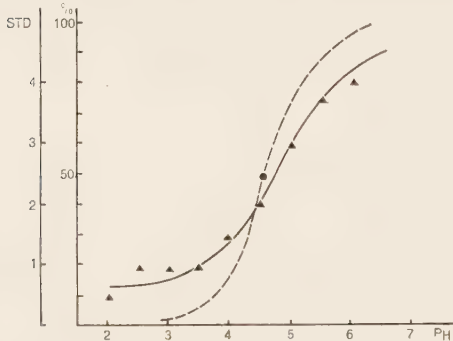


Abb. 19. Permeiergeschwindigkeit und Dissoziation der IES

----- Dissoziationskurve der IES
 v Minimalzeit bis zum Zustandekommen einer positiven SALKOWSKI-Reaktion (Seitenwurzeln von *Cucumis sativus*, Alter 7 Tage, IES 250 γ /cc, 20 % Zitronensäure-Phosphorsäure-Puffer, Temperatur 20 °C)

sei, daß die IES dann nicht oder nur in sehr geringem Maße in die Pflanze eindringt. Zur Feststellung der pH-Abhängigkeit des Eindringens der IES wurde die Einlegezeit von Wurzeln in IES-Lösungen von verschiedenem pH gemessen, die nötig war, damit eben eine positive IES-Reaktion in ihnen festgestellt werden konnte. Es zeigte sich, daß diese Zeiten mit steigendem pH zunahm, bei pH 7 und darüber aber unendlich wurden. Wird die Permeierzeit in Abhängigkeit vom pH als Kurve aufgezeichnet, so verläuft sie gleich wie die Dissoziationskurve. Dadurch wird die bekannte Tatsache (ALBAUM, KAISER und NESTLER, 1937), daß die IES in

Molekülform rascher eindringt als ionisiert, erneut bewiesen und konstatiert, daß bei pH 7 und höher keine Aufnahme mehr stattfindet (Abb. 19).

Wenn aus den Aufnahmezeiten die Größe v berechnet wird, die angibt, wieviel mal schneller die Moleküle im Vergleich mit den Ionen aufgenommen werden, so resultiert aus meinen Versuchen bei 20 ° C die Zahl 8. HUBER (1951, S. 523) fand bei 24 ° C und ebenfalls am Licht die Zahl 7,7.

Die Aufnahme anderer Wachsstoffe durch die Wurzel

Für α -Naphthyllessigsäure (NES) konnte trotz sehr großer darauf verwendeter Mühe leider keine histochemische Nachweisreaktion gefunden werden¹⁾. Hingegen wurde NES doch zusammen mit IES zu speziellen Versuchen über die Wachsstoffaufnahme verwendet. Dabei wurde weder eine gegenseitige Verdrängung der beiden Wachsstoffe, noch eine Blockierung von Reaktionsorten durch sie festgestellt, was wohl kaum anders interpretiert werden kann, als daß die beiden Wachsstoffe an verschiedenen Reaktionsorten des Protoplasmas angreifen.

¹⁾ Ich möchte an dieser Stelle Herrn J. STUDINGER (Analytisches Laboratorium des Kantons Basel-Stadt) meinen besten Dank für seine diesbezüglichen Bemühungen aussprechen.

Für β -Indolylpropionsäure konnte nachgewiesen werden, daß die Aufnahme an den gleichen Orten geschieht wie diejenige der IES. Auch mit Indolylpropionsäure (IPS) kann der Unterschied in der Aufnahmeintensität zwischen Sproß und Wurzel klar demonstriert werden, und die Anreicherung der IPS erfolgt ebenfalls in den wachsenden Geweben.

Nach WILDMAN, FERRI und BONNER (1947), WILDMAN und BONNER (1948) usw. entsteht IES enzymatisch aus Tryptophan. Es war deshalb interessant, Versuche über die Aufnahme von Tryptophan durch die Pflanze zu machen. Dieses kann ja durch die EHRLICH-Reaktion gut identifiziert werden. Dazu wurden Lösungen verwendet, die in Konzentration und pH den bisher angewandten IES-Lösungen entsprachen. Die Einlegezeiten variierten von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen (im letzten Falle zeigten die Keimlinge ein normales Wachstum in der Lösung). In keinem Fall konnte eine Aufnahme des Tryptophans und eine Lokalisierung in bestimmten Geweben nachgewiesen werden. Auch zeigten sich keine Anzeichen einer Umwandlung von Tryptophan in IES nach leichtem Erwärmen oder steigendem pH. — Diese Versuche wurden unter den verschiedensten Verhältnissen durchgeführt: abgetrennte Wurzeln oder ganze Pflanzen eingelegt, ganze Pflanzen eingestellt, Lösung belüftet oder nicht, dunkel und hell. Die Konzentration war so hoch, daß eine Anreicherung hätte festgestellt werden müssen. Interessanterweise reichte die Konzentration nicht einmal aus, um in den verholzten Gefäßen eine Lignin/Indol-Reaktion zu bewirken, wie man sie im Modellversuch leicht erhält. — Aus meinen Versuchen geht also hervor, daß Tryptophan, wenn überhaupt, nicht in demselben Maß durch Keimlinge von Mais und Gurke aufgenommen wird wie IES und daß Tryptophan nicht in der für Indol-Wuchsstoffe charakteristischen Art angereichert wird.

Wurden die Keimlinge nach der Behandlung mit Tryptophan in IES eingelegt, so wurde diese in der bekannten und charakteristischen Weise aufgenommen. Eine Blockierung der Adsorptionssorte für IES im Gewebe fand also durch Tryptophan sicher nicht statt.

Die IES-Speicherung durch den Sproß

Wie ich im vorhergehenden Kapitel feststellte, zeigt der Sproß im Vergleich zur Wurzel mit den angewandten Reagenzien keine IES-Reaktion. Bei genauer Betrachtung läßt sich aber dann erkennen, daß auch der Sproß IES aufnimmt, wie ja schon die quantitativen Untersuchungen zeigten (SUTTER 1944; eigene Versuche S. 225 ff.).

Am Mais-Embryo läßt sich die schwache Aufnahme der IES durch die Koleoptile leicht zeigen. An verschiedenen Keimungsstadien der *Cucumis*-Pflanze sei das Verhalten des Hypokotyls gegenüber IES geschildert¹⁾ (Abb. 20).

Zwei Tage alte Keimpflanze: Wurzel von 10 mm Länge und gebogenes Hypokotyl von 8 mm Länge. Wurzel positive Reaktion, Hypokotyl negativ, Kotyledonen negativ.

¹⁾ Versuchsobjekt *Cucumis sativus*, Alter vom Beginn des Quellens an gerechnet. Nachher je 10 Stunden in IES-Lösung 500 γ /cc submers eingelegt.

Drei Tage alt, großes Exemplar: Wurzel 40 mm, einige Seitenwurzeln. Sproß 15 mm (gerades Stück und Bogen). Wurzel positiv, deutliche Zonenbildung. Sproß: Kotyledonen negativ, Hypokotylbogen bis 2 bis 3 mm unterhalb der Kotyledonen negativ, dann scharf abgegrenzt Übergang zu einer Zone positiver Reaktion. Das ganze gerade Hypokotylstück reagiert positiv,

wobei die Stärke der Reaktion von oben nach unten abnimmt. In der Gegend des Wurzelhalses ist sie sehr schwach.

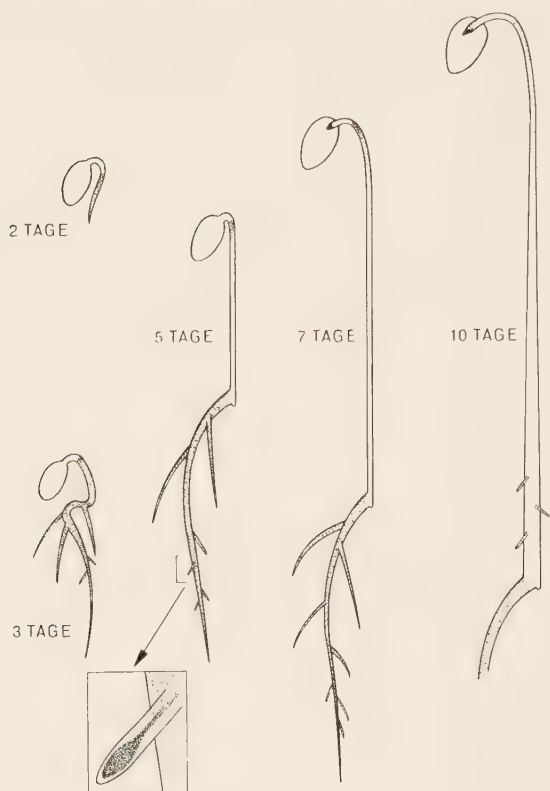


Abb. 20. Verteilung von aufgenommenem Heteroauxin (IES) in verschieden alten Keimpflanzen von *Cucumis sativus*. (Je 10 Std. in IES 500 γ /cc, 18°C) Punktiert: positive SALKOWSKI-Reaktion. In allen Wurzelspitzen wurde eine besonders intensive Reaktion festgestellt, wie es im Detailbild der 5-Tage-Pflanze veranschaulicht ist

Fünf Tage alt: Wurzel 70 mm, Sproß 50 mm. Wurzel positiv. Sproß: Kotyledonen negativ, dann negative Zone bis 3 mm unterhalb von ihnen, dort scharfe Grenze. Positive Reaktion über 10 mm des Hypokotyls, maximale Intensität am oberen Ende, dann auslaufend. Unterer Teil des Hypokotyls negativ.

Sieben Tage alt: Wurzel 80 mm, Sproß 100 mm. Prinzipiell gleiches Bild. Wenn jetzt das erste Blatt entsteht, reagiert es gleich stark positiv wie die wachsenden Zonen der Wurzeln. Am Hypokotyl reagieren 10 mm des oberen Endes positiv, die Reaktion ist etwas schwächer als die Gesamtreaktion der Wurzel. Übriges Hypokotyl negativ.

Zehn Tage alt: Gleiches Bild. Die Intensität der positiven Zone am Hypokotyl nimmt ab. Das erste, noch sehr kleine Blatt reagiert stark positiv. Die Adventivwurzeln, die jetzt entstehen, zeigen die gleiche Reaktion wie die Haupt- und Seitenwurzeln, sie stechen auffallend gefärbt aus dem durch die IES-Reagenzien ungefärbten Sproßgewebe heraus.

Die stark positiv reagierende Zone am oberen Ende des Hypokotyls ist dessen wachsende Zone. Sie beginnt unterhalb der Kotyledonen. Die Zone stärksten Wachstums ist einige Millimeter von diesen entfernt. Beim Altern verschiebt sie sich etwas nach unten (SUTTER 1944, S. 215).

Genau wie bei den Wurzeln gibt sich beim Sproß also die wachsende Zone durch eine intensive Anreicherung von IES zu erkennen. Deutlich sichtbar ist, daß die obersten Millimeter des Hypokotyls nicht wachsen und während des ganzen Wachstums unverändert nach oben geschoben werden.

Die Reaktion der *A d v e n t i v w u r z e l n* entspricht derjenigen der übrigen Wurzeln. Sie zeigen eine deutlich betonte Wachstumszone an der Spitze und im ganzen eine kräftig positive Reaktion, wodurch sie sich vom Sproß sehr deutlich unterscheiden. Werden die Keimpflanzen von *Cucumis* bis zum Wurzelhals in IES-Lösung eingestellt und in einer 100 % wasserdampf-gesättigten Atmosphäre gehalten (um den Transpirationssog auszuschalten), so kommt die Reaktion in den Adventivwurzeln doch gleich zustande wie beim totalen Einlegen. Auch im Zentralzylinder läßt sich dann die IES bis auf $\frac{1}{3}$ der Sproßhöhe nachweisen. Diese Befunde sprechen für einen raschen, *a k t i v e n* *T r a n s p o r t* und Anhäufung am Reaktionsort.

Bei allen histochemischen Untersuchungen ergab sich nie ein Befund, der als Nachweis von *a u t o c h t h o n e n* *W u c h s s t o f f e n* der Pflanze hätte interpretiert werden können.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine Methode zur fluorometrischen Bestimmung der β -Indolylessigsäure (IES) ausgearbeitet. Sie beruht auf der Messung der Intensität der Fluoreszenz, die entsteht, wenn zu IES-Lösungen in geeigneter Weise Kupfersulfat und Schwefelsäure zugegeben werden.
2. Sie gestattet noch eine Erkennung von 0,2 γ IES/cc. Ihre Empfindlichkeit ist so, daß Konzentrationen, die um 0,05 bis 0,1 γ /cc differieren, unterschieden werden können.
3. Mit dieser Methode wurde die Abnahme des IES-Gehaltes von Versuchslösungen bestimmt, in die Hypokotyle von *Cucumis sativus* eingelegt waren.
4. Diese Versuche ergaben, daß die Hypokotyle in drei Stunden (bei 24 ° C im Dunkeln) 70 % jener IES-Menge aufnahmen, die dem Konzentrationsgleichgewicht zwischen der Versuchslösung und dem Wassergehalt der Hypokotyle entspricht.
5. Die im Gewebe der Pflanzen aus Lösungen aufgenommene und gespeicherte IES wurde mittels folgender chemischer Reaktionen lokalisiert: Kupfersulfat-Salzsäure-Reaktion, EHRLICHs Reaktion (mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure) und SALKOWSKI-Reaktion (mit Eisenchlorid und Salzsäure).
6. Durch den histochemischen Nachweis aufgenommenen Wuchsstoffs wurde folgendes festgestellt: Wurzel und Sproß unterscheiden sich in bezug auf die IES-Speicherung stark; die Wurzel speichert IES wesentlich intensiver als der Sproß. Diese Beobachtung wurde an *a l l e n* untersuchten

Pflanzen gemacht: *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Vicia faba*, *Arachis hypogaea*, *Zea Mays*.

7. Dagegen wurde bei den histochemischen Untersuchungen nie eine Beobachtung gemacht, die als Nachweis pflanzeneigener (autochthoner) Wuchsstoffe hätte interpretiert werden können.
8. In der Wurzel konnte eine starke Anreicherung der aufgenommenen IES in den wachsenden Geweben (Meristem, Streckungszone und Primordien der Seitenwurzeln) festgestellt werden, dagegen nicht in den Wurzelhaaren. Haupt- und Seitenwurzeln verhalten sich gleich; ebenso zeigen die Adventivwurzeln das gleiche Verhalten.
9. In diesen wachsenden Geweben haftet die IES so stark, daß sie auch durch mehrstündiges Wässern nicht aus ihnen entfernt werden kann.
10. Beobachtungen über das Eindringen der IES in die Pflanze bestätigen bekannte Tatsachen, wie den stark lipophilen Charakter des Heteroauxins (IES) und die pH-Abhängigkeit des Permeierens.
11. Im ausgewachsenen Sproß ließ sich histochemisch keine Anreicherung der IES nachweisen, wohl aber in seiner Wachstumszone.
12. Es wurde ein aktiver Transport der IES in der Pflanze beobachtet.
13. β -Indolylpropionsäure wird an den gleichen Orten und in ähnlicher Weise gespeichert wie IES, während für Tryptophan keine Aufnahme festgestellt werden konnte.
14. Kombinierte Versuche mit IES und α -Naphthyllessigsäure ergaben, daß die beiden anerkannt hochwirksamen Wuchsstoffe sich weder von den Reaktionsorten verdrängen noch solche blockieren; es muß daher geschlossen werden, daß sie an differenten und voneinander unabhängigen Reaktionsorten des Protoplasmas angreifen.

Die vorliegende Arbeit entstand 1951/1952 im Botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. M. Geiger-Huber. Es sei mir gestattet, ihm hier meinen herzlichen Dank auszusprechen für seine rege Anteilnahme an meiner Arbeit und die tatkräftige Unterstützung durch die Mittel des Instituts. Ferner danke ich dem damaligen 2. Assistenten cand. phil. A. Schaefer und Fr. I. Leupin für die Mithilfe bei der Anfertigung der photographischen Aufnahmen, sowie Fr. L. de Vries für ihre Hilfe bei der Ausführung der fluorometrischen Bestimmungen.

Literaturverzeichnis

- ABDERHALDEN, E., 1946: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 23. Auflage, Basel.
- ALBAUM, H. G., KAISER, S., and NESTLER, H. A., 1937: The relation of hydrogen-ion concentration to the penetration of 3-indole acetic acid into *Nitella* cells. Amer. J. Bot. 24, 513—518.
- ALGEUS, S., 1946: Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie der *Chlorophyceen*. Botaniska Notiser (Lund), 129—280.
- ARNOLD, V., 1911: Die Uroroseinfarbstoffe des Harns. Z. physiol. Chem. 71, 1—6.

- BERTHELOT, A., AMOUREUX, G. et DEBERQUE, S., 1939: Sur la recherche de traces d'acide β -indolyle-acétique en présence de tryptophane. C. R. Soc. Biol., 131, 981—993.
- BONNER, J., 1950: Plant Biochemistry. New York.
- DANCKWORTT, P. W., 1940: Lumineszenz-Analyse im filtrierten Ultraviolettlicht. Leipzig.
- DETTWEILER, CHR., 1942: Über den Einfluß des Heteroauxins auf die Wuchsstoffbildung in höheren Pflanzen. Planta 33, 258—277.
- FÖRSTER, TH., 1951: Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen.
- GARCIA-BLANCO, J. und ROYO, F., 1943: Eine neue Reaktion zur Unterscheidung von Indolderivaten. Medicina española 9, 39—40.
- GEIGER-HUBER, M. und BURLET, E., 1936: Über den hormonalen Einfluß der β -Indolyl-lessigsäure auf das Wachstum isolierter Wurzeln in Organkultur. J. wiss. Bot. 84, 233—253.
- — und SUTTER, E., 1943: Die Aufnahme synthetischer Wuchsstoffe durch die Pflanze. Verh. Schweiz. Natf. Ges., 121—123.
- GLICK, D., 1949: Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York.
- GNEZDA, J., 1899: Sur des réactions nouvelles des bases indoliques et des corps albuminoides. C. R. Acad. des Sci. 128, 1584—1587.
- GORDON, M. and MITCHELL, H. K., 1949. A fluorometric method for the estimation of tryptophane. J. Biol. Chem. 180, 1065—1070.
- GRISOLIA, S., 1943: Neue Reaktionen einiger Indolderivate. Trabajos inst. nacl. cienc. med. Madrid 3, 367—372.
- v. GUTTENBERG, H., 1949: Wachstum und Bewegung. Fortschritte der Botanik 12, 323—339 (Sammelreferat).
- HAITINGER, M., 1937: Die Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie. Wien und Leipzig.
- HAMENCE, J. H., 1943 I: A fluorescence-test for indole-3-acetic acid. The Analyst 68, 13—14.
- —, 1943 II: Detection and estimation of auxins in organic manures. The Analyst 68, 356—361.
- HIEKE, K., 1942/43: Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide II. Planta 33, 185—205.
- HOLT, P. F. and CALLOW, H. J., 1943: The detection of indole-3-acetic acid. The Analyst 68, 351—355.
- HOMER, A., 1915: A spectroscopic examination of the color reactions of certain indole derivatives and of the urine. J. Biol. Chem. 22, 345—368.
- HUBER, H., 1951: Über den Einfluß der Belichtung auf die Wuchsstoffempfindlichkeit der Keimstengel von *Cucumis sativus* L. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 61, 499—538 (Diss. Basel).
- KELLER, C. C., 1896: Neue Studien über *Secale cornutum*, Ergotin, Cornutin, Spasmodin. Schweiz. Wschr. für Chemie und Pharmacie 34, 65—74.
- KISSER, J., 1950: Vortragsreferat vom 1. Int. Kongreß für Mikrochemie Juni 1950 in Graz, in Chimie analytique 32, 313, 1950.
- KOSCHARA, W., 1936: Isolierung eines gelben Farbstoffs (Uropterin) aus Menschenharn. Z. physiol. Chem. 240, 127—151.
- LEFÈVRE, J., 1938: Sur la présence normale d'acides indoliques et particulièrement de l'acide β -indolyle acétique dans diverses plantes supérieures. C. R. Acad. des Sci. 206, 1675—1677.
- LEPESCHKIN, W. W., 1938: Kolloidchemie des Protoplasmas. Dresden und Leipzig.
- LINSER, H., 1951: Versuche zur chromatographischen Trennung pflanzlicher Wuchsstoffe. Planta 39, 377—401.
- LISON, L., 1936: Histochimie animale. Paris.
- MASAYAMA, T. und ITAGAKI, C., 1941: Eine Modifikation der Tryptophanbestimmung nach Tillmans und Alt. Z. physiol. Chem. 270, 41—44.
- METZNER, P., 1930: Über die Abgabe fluoreszierender Stoffe durch quellende Samen und Früchte. Biochem. Z. 224, 448—458.

- MITCHELL, J. W. and BRUNSTETTER, B. C., 1939: Colorimetric methods for the quantitative estimation of indole-3-acetic acid. *Bot. Gazette* **100**, 802—816.
- MOLISCH, H., 1921: *Mikrochemie der Pflanze*. Jena.
- MONTIGNIE, E., 1932: Nouvelle réaction colorée des composés pyrroliques et indoliques. *Bull. Soc. Chim. France* **51**, 689—690.
- MORTON, A. A., 1946: *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*. New York.
- SALKOWSKI, E., 1883: Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis I. *Z. physiol. Chem.* **8**, 417—466.
- —, 1885: Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Z. physiol. Chem.* **9**, 23—33.
- —, 1919: Über die Ehrlichsche Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und das Urorosein. *Biochem. Z.* **97**, 122—128.
- SCHMID, K., 1949: Zusammensetzung des Wal-Myoglobins. *Helv. Chim. Acta* **32**, 1198—1208.
- SEILER, L., 1951: Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **61**, 622—663 (Diss. Basel).
- SKOOG, F., 1938: Absorption and translocation of auxin. *Amer. J. Bot.* **25**, 361—372.
- SÖDING, H., 1952: *Die Wuchsstofflehre*. Stuttgart.
- SPIES, J. R., 1950: Determination of tryptophane with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Anal. Chem.* **22**, 1447—1449.
- STOLL, A., HOFMANN, A. und PETRZILKA, TH., 1946: Die Dihydroderivate der rechtsdrehenden Mutterkornalkaloide. *Helv. Chim. Acta* **29**, 635—653.
- STOPPANI, A. O. M., 1945: Determination of indole-3-acetic acid. *Anales soc. quim. argentina* **33**, 63—70, zit. nach Chem. Abstr. **40**, 3369, 1946.
- STRUGGER, S., 1949: *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie*. Hannover.
- SUTTER, E., 1944: Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **54**, 197—244 (Diss. Basel).
- TAUBER, H., 1952: New color reaction for steroids with perchloric acid. *Anal. Chem.* **24**, 1494—1495.
- THIMANN, K. V. and BONNER, J., 1932: Studies on the growth hormone of plants. II. The entry of growth substance into the plant. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **18**, 692—701.
- — and — —, 1933: The mechanism of the action of the growth substance of plants. *Proc. Roy. Soc. B.* **113**, 126—149.
- VAN URK, H. W., 1929: p-Dimethylaminobenzaldehyde als Reagens op organische Geestesmiddelen. *Pharm. Weekblad (Amsterdam)* **66**, 101—108.
- WEEHUIZEN, F., 1911: Über indoloide Düfte. *Rec. des trav. bot. néerl.* **8**, 97—107.
- WEISS, M., 1947: Entstehung des Magenkrebses durch Indol und Indolderivate der Eiweißfäulnis. *Wiener klin. Wschr.* **59**, 40—43.
- WILDMAN, S. G., FERRI, M. G. and BONNER, J., 1947: The enzymatic conversion of tryptophane to auxin by spinach leaves. *Arch. of Biochem.* **13**, 131—144.
- — and BONNER, J., 1948: Observations on the chemical nature and formation of auxin in the avena coleoptile. *Am. J. Bot.* **35**, 740—746.
- WINKLER, S., 1934: Über die Tryptophanreaktion von Adamkiewicz-Hopkins. *Z. physiol. Chem.* **228**, 50—60.
- — und PETERSEN, S., 1935: Tryptophanreaktion und Nachweis des Heteroauxins. *Z. physiol. Chem.* **231**, 210—212.
- YU WEI TANG and BONNER, J., 1947: The enzymatic inactivation of indole-3-acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. of Biochem.* **13**, 11—25.
- ZYUNKI TANAKA, 1940: A colorimetric detection of indole-3-acetic acid. *J. Pharm. Soc. Japan* **60**, 76—83, zit. nach Chem. Abstracts **34**, 3622, 1940.

Curriculum vitae

Am 29. Januar 1922 wurde ich, Victor Alexander Ebert, als Sohn des Alfred Ebert, Dr. phil. II und Ingenieur-Chemiker, von Zürich, und der Elvira Ebert, geb. Engel, in Bern geboren. Ich besuchte die Schulen von Bern und Basel und bestand im Frühjahr 1941 an der Kantonalen Handelsschule Basel die Reifeprüfung. Ich immatrikulierte mich im Frühjahr 1942 an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, wo ich mich dem Studium der Chemie und biologischer Fächer widmete. Nach dem Abschluß des Studiums der Chemie entschloß ich mich 1949 zu einem Wechsel auf das Hauptfach Botanik. In der Folge bestand ich die Nebenfachexamina in Hygiene-Bakteriologie, Chemie und Physikalischer Chemie und schloß meine Studien im Herbst 1952 ab. Meine Dissertation verfaßte ich 1951 bis 1952 unter der Leitung von Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER. Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse folgender Professoren und Dozenten:

E. BATSCHELET, E. BERGER, H. BLOCH, B. DUKOR, S. EDLBACHER †, H. ERLNMEYER, J. GANTNER, M. GEIGER-HUBER, C. GROB, F. GRÜN, E. HANDSCHIN, E. HEITZ, P. HUBER, W. KUHN, H. LÜDEKE, R. MEIER, H. MOHLER, W. MUSCHG, A. PORTMANN, T. REICHSTEIN, M. REINHARD, P. RUGGLI †, E. SCHLITTLER, O. SCHÜEPP, G. SENN †, J. TOMCSIK, F. VERZÁR, W. VISCHER, R. WIZINGER.

Allen meinen verehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aus.